

TIEFKÜHLKONSERVIERUNG VON
KANINCHEN-THROMBOZYTEN DURCH RASCHES
GEFRIEREN UND TAUEN. PRÜFUNG DER
ZIRKULATIONSFÄHIGKEIT NACH MARKIERUNG
MIT $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$

Fritz Weber

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554605_0039

AUS DEM INSTITUT FÜR HÄMATOLOGIE DER GSF
ASSOZIATION MIT EURATOM, MÜNCHEN

(Kommissarischer Leiter: Priv. Doz. Dr. St. Thierfelder)

TIEFKÜHLKONSERVIERUNG VON KANINCHEN-THROMBOZYTEN
DURCH RASCHES GEFRIEREN UND TAUEN. PRÜFUNG DER
ZIRKULATIONSFÄHIGKEIT NACH MARKIERUNG MIT $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$

Inaugural - Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig - Maximilian - Universität München

vorgelegt von
Fritz Weber
aus Weilheim i. OB
München 1973

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter	:	Prof. Dr. Marx
Mitberichterstatter	:	Prof. Dr. Schwiegk
Dekan	:	Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 26.6.1973



Meinem Vater in Dankbarkeit gewidmet

I N H A L T S A N G A B E

A. Einleitung	Seite	1
B. Methodik	Seite	4
1. Herstellung der Thrombozyten- konzentrate	Seite	5
2. Gefriervorgang	Seite	8
3. Lagerung der Thrombozyten- konzentrate	Seite	8
4. Tauvorgang	Seite	8
5. Bestimmung der Gefrier- und Taugeschwindigkeit	Seite	9
6. Bestimmung der Thrombozyten- lebensdauer mit ^{51}Cr	Seite	10
C. Ergebnisse	Seite	13
1. Einfluß der Gefriergeschwindigkeit auf die Thrombozytenlebensdauer	Seite	13
2. Einfluß der Taugeschwindigkeit auf die Thrombozytenlebensdauer	Seite	14
3. Einfluß verschiedener Gefrier- schutzstoffe auf die Thrombozyten- lebensdauer	Seite	16
D. Diskussion	Seite	18
E. Zusammenfassung	Seite	21
F. Literaturverzeichnis	Seite	22

A. EINLEITUNG

Die Transfusion von Thrombozyten ist indiziert bei lebensbedrohlichen thrombopenischen Blutungen. Als deren Ursache kommen Knochenmarksdepressionen jeglicher Genese, Auftreten antithrombozytärer Antikörper, wie z.B. beim Morbus Werlhof, Verteilungsstörungen z.B. bei einer Splenomegalie, sowie ein vermehrter Verlust oder Verbrauch infolge Blutung oder Sepsis in Frage. Grundsätzlich können Thrombozytentransfusionen in Form von Frischblut, thrombozytenreichem Plasma oder Thrombozytenkonzentraten durchgeführt werden. Frischblut hat den Vorteil, daß es am schnellsten zur Verfügung steht. Es ist auch dann zu bevorzugen, wenn gleichzeitig eine Anämie besteht. Außerdem gewährt diese Art der Übertragung derzeit den geringsten Grad der Thrombozytenschädigung. Thrombozytenreiches Plasma soll übertragen werden, wenn neben der Thrombopenie ein Plasmabedarf besteht. Die Übertragung von Thrombozytenkonzentraten ist dann vorzuziehen, wenn Thrombozyten in sehr großen Mengen und über längere Zeiträume substituiert werden müssen. Die Herstellung dieser Thrombozytenkonzentrate kann aus Frischblutkonserven oder mittels Thrombopherese erfolgen.

Die Lebensdauer der Thrombozyten in vivo ist im Vergleich zu der der Erythrozyten oder Lymphozyten sehr kurz. Sie beträgt beim Menschen neun bis elf Tage. Bei Aufbewahrung in vitro sind die Thrombozyten maximal 12 - 24 Stunden lebens- bzw. funktionsfähig.

Wegen dieser kurzen Lebensdauer der Thrombozyten in vivo wie

in vitro wurden seit etwa 20 Jahren zahlreiche Versuche zur Konservierung unternommen. Die Forderung der Konservierbarkeit hat erstens wirtschaftliche Gründe, zweitens könnte ein unvorhersehbarer großer Bedarf ohne Schwierigkeiten überbrückt werden und drittens könnte die HL-A-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger wesentlich leichter berücksichtigt werden.

So wurde zunächst versucht, durch Verwendung bestimmter Zusätze wie z. B. von Inosin, Adenin, Guanosin und anderen Stoffen eine Verlängerung der Lebensfähigkeit der Thrombozyten in flüssigem Zustand zu erreichen, jedoch ohne nennenswerten Erfolg (2, 9).

Eine brauchbare Konservierung kann theoretisch nur von einer vollständigen Unterbrechung aller biochemischen Zellvorgänge erwartet werden, wie es mit der Tiefkühlkonservierung möglich ist.

Nach den seit etwa 15 Jahren meist in Tierversuchen auf diesem Gebiet durchgeführten Forschungsarbeiten erwiesen sich die Gefrier- und Taugeschwindigkeiten sowie die Verwendung geeigneter Gefrierschutzstoffe als wesentlich für den Erfolg der jeweiligen Methoden. Einige Autoren (3, 4, 5, 6) erzielten ihre besten Ergebnisse bei einem Temperaturabfall von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ von $+25^{\circ}\text{C}$ bis -25°C und von $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis zur Endtemperatur von -80°C . Andere Forschungsgruppen (7, 13) berichten über vergleichbare Resultate bei einem Temperaturabfall von $5^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ bis zur Endtemperatur von -196°C . Insgesamt konnten die verschiedenen Gruppen keine befriedigende Technik der Tiefkühlkonservierung aufzeigen.

Nach den bisherigen Forschungen liegt die Hauptursache der Zellschädigung während des Gefrier- und Tauvorganges in der Ausbildung von Eiskristallen im Intra- und Extrazellularraum. Diese kann einerseits durch intra- und extrazellulär wirksame Gefrierschutzstoffe wie Glyzerin, Dimethylsulfoxyd (DMSO) und Dimethylacetamid (DMAC) bzw. Polyvinylpyrrolidin (PVP) und Dextran gemindert werden. Dabei dringen die intrazellulären Schutzstoffe in die Zelle ein und binden dort einen Teil des Wassers, während die extrazellulären Schutzstoffe vor allem außerhalb der Zelle eine Eiskristallbildung verhindern sollen. Diese kann andererseits durch einen genügend raschen Temperaturabfall bzw. Temperaturanstieg zwischen Gefrierpunkt und Rekristallisationspunkt vermieden werden, wobei die intra- und extrazellulären Flüssigkeiten amorph vitrifiziert werden (12, 14).

Das beste Kriterium zur Bestimmung der Wirksamkeit von Thrombozytentransfusionen ist das Sistieren der Blutung. Als beste Arbeitsmethode hat sich die Bestimmung der Lebensdauer der Thrombozyten nach Markierung mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ erwiesen.

In der vorliegenden Arbeit wird mit dem Ziel der Anwendung beim Menschen im Tierversuch die Lebensdauer ^{51}Cr -markierter Kaninchen - Thrombozytenkonzentrate bei Gefriergeschwindigkeiten von $10^\circ\text{C}/\text{sec}$ bzw. $100^\circ\text{C}/\text{sec}$ mit und ohne Zusatz von Schutzstoffen, sowie nach raschem Tauen bestimmt und mit der in vivo Lebensdauer ungefrorener frischer Thrombozytenkonzentrate (Kontrolle) verglichen.

B. METHODIK

Die Untersuchungen über die Lebensdauer gefrorener und getauter Thrombozytenkonzentrate wurden an gesunden Kaninchen durchgeführt. Wir transfundierten die in vitro mit ^{51}Cr markierten Plättchen eines Spendertieres nach entsprechender Vorbehandlung homolog einem Empfängertier und bestimmten in den Folgetagen den Aktivitätsabfall in vivo.

Vier Thrombozytenkonzentrate wurden vorher in flüssigem Helium (-268°C), 13 in flüssigem Stickstoff (-196°C) jeweils ohne Zusatz von Gefrierschutzstoffen gefroren. Weiteren 13 in flüssigem Stickstoff gefrorenen Konzentraten setzten wir Schutzstoffe in Form von Glyzerin (6 Fälle, $n = 6$) bzw. einer Kombination aus Dimethylacetamid und Dextrose ($n = 7$) zu. Zehn frisch injizierte ungefrorene Thrombozytenkonzentrate dienten als Kontrolle.

Hohe Gefriereschwindigkeiten konnten durch direktes Eintropfen der Thrombozytenkonzentrate in den flüssigen Stickstoff bzw. das flüssige Helium erzielt werden, wobei die gefrorenen Tropfen einen Durchmesser von durchschnittlich 2,6 mm aufwiesen. Rasches Tauen erreichten wir durch direktes Einbringen der gefrorenen Tropfen in verschiedene Volumina homologen Plasmas bzw. physiologischer Kochsalzlösung.

Die Bestimmung der Lebensdauer erfolgte nach Modifikation der von Aster (1) angegebenen Methode. Alle Versuche wurden in sterilisierten unsilikonisierten Glasgefäßen bei Zimmertemperatur ausgeführt.

Die statistische Beurteilung der Ergebnisse erfolgte nach dem t- Test (Student).

1. Herstellung der Thrombozyten - konzentrate

a) Gewinnung der Thrombozyten

Von einem gesunden Spendertier wurden durch Herzpunk-
tion bis zu 84 ml Blut entnommen und mit ACD - Lösung_{x)}
im Verhältnis 6,6 : 1 vermischt. Das ACD - Blut wurde
dann 14 Minuten bei 450 g, der thrombozytenreiche Über-
stand 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert, um ein nahezu
erythro- und leukozytenfreies, thrombozytenreiches Plas-
ma zu erhalten.

b) Einstellung des pH - Wertes

Anschließend wurde der pH - Wert der Suspension mit
ACD - Lösung_{x)} auf einen Wert von $6,5 \pm 0,2$ Korrigiert,
wodurch sich bei der späteren Resuspension keine Schwie-
rigkeiten ergaben.

c) Anreicherung der Thrombozyten zur Markierung

In einer weiteren Zentrifugation bei 1000 g für 14 Minuten
wurden die Thrombozyten schließlich zur Markierung an-
gereichert. Der nun thrombozytenarme Überstand wurde

x) ACD - Lösung:	Natrium citricum	0,085 mol
	Acidum citricum	0,065 mol
	Dextrose	2,0 %

abgekippt, das thrombozytenreiche Sediment vorsichtig resuspendiert und zur Markierung bereitgestellt. Das abgeschüttete Plasma fand später Verwendung zum Waschen der markierten Thrombozytensuspension und zur Resuspension der zu transfundierenden Thrombozytenkonzentrate.

d) Markierung der Thrombozytenkonzentrate

Das resuspendierte Thrombozytenkonzentrat_x) wurde mit $100 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ in Form von $\text{Na}_2 ^{51}\text{CrO}_4$ versetzt, unter gelegentlichem Umschütteln 15 Minuten lang inkubiert und anschließend bis auf einen Rest von 6 ml mit dem oben erwähnten Plasma einmal gewaschen. Zur Reduktion des nicht zellgebundenen 6-wertigen ^{51}Cr wurden 5 ml Ascorbinsäure in Form von Cebion forte (Merckh) hinzugefügt. Die nun verdünnte Suspension wurde erneut bei 1000 g 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.

e) Bereitstellung der Thrombozytenkonzentrate für den Gefriervorgang

Alle Thrombozytenkonzentrate, denen bei der Tiefkühlkonservierung kein Schutzstoff zugesetzt werden sollte, und die Kontrollen wurden nach der Markierung mit ^{51}Cr auf ein Endvolumen von 6 ml resuspendiert. In diesen Zubereitungen entsprachen die Thrombozytenzahlen etwa 75 % der nach dem gesammelten Blut zu erwartenden Menge.

Bei der Verwendung von Schutzstoffen wurde die endgültige Menge des Thrombozytenkonzentrates von der Endkonzen-

x) Spezifische Aktivität 50 m Ci/mg

tration des betreffenden Additivs bestimmt:

Endvolumen bei Verwendung von Glycerin als Schutzstoff 6 ml,
bei Verwendung von DMAC und Dextrose 10 ml.

Als Gefrierschutzmittel verwendeten wir, wie schon oben angegeben, einerseits Glycerin_x), andererseits eine Kombination aus Dimethylacetamid und Dextrose_{xx}). Diese Substanzen wurden den Thrombozytenkonzentraten etwa 15 Minuten vor dem Gefriervorgang zugesetzt.

f) Bereitstellung der getauten Thrombozytenkonzentrate zur homologen Transfusion

Alle getauten Thrombozytensuspensionen wurden mit der bereits oben erwähnten ACD-Lösung erneut auf einen pH - Wert von $6,5 \pm 0,2$ eingestellt und dann 20 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Nach dem Abschütten des thrombozytenfreien Überstandes wurde das Thrombozytenkonzentrat mit 5 ml frischem homologen Plasma resuspendiert und zur Transfusion bereitgestellt.

Die mit Glycerin behandelten Thrombozytenkonzentrate wurden nach dem Tauen mit 13 % Natriumcitrat versetzt, um den Gefrierschutzstoff weitgehend zu entfernen (5). Die Endkonzentration des Glycerins in diesen Proben wurde nicht bestimmt.

x) 20 % Glycerin $\frac{V}{V}$ in $K_3 PO_4$ -Puffer (270 mosm), Seitz gefiltert.

xx) DMAC 20,0 Dextrose 20,0 Aqua bidest ad 100,0

Mit dem Lichtmikroskop konnte kein sicherer Beweis einer morphologischen Zellschädigung erbracht werden. Lediglich ein Teil der in Glyzerin gefrorenen Thrombozyten war langgestreckt oval. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß von den mit DMAC und Dextrose versetzten gefrorenen und getauten Thrombozytenkonzentraten etwa 10 - 20 % irreversibel geschädigt waren. Ein großer Teil der übrigen Thrombozyten wies im Bereich der Mitochondrien Vakuolen mit Verlust der Cristae auf. Der restliche Teil der Thrombozyten unterschied sich morphologisch nicht von frischen Thrombozyten.

2. Gefriervorgang

Mittels eines Dauerinfusionsgerätes_{x)} wurde das jeweilige Thrombozytenkonzentrat (mit oder ohne Zusatz von Gefrierschutzstoffen) direkt auf die ruhige Oberfläche von flüssigem Stickstoff (- 196⁰C) bzw. flüssigem Helium (- 268⁶C) getropft. Bei einer Kanülengröße V₂A Nr. 20 wurden gefrorene Kügelchen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 2,6 mm erhalten.

3. Lagerung der Thrombozytenkonzentrate

In allen Versuchsreihen wurden die gefrorenen Thrombozytenkonzentrate für vier Tage bei - 196⁰C in flüssigem Stickstoff gelagert.

4. Tautvorgang

Rasches Tauen der gefrorenen Thrombozytenkonzentrate wurde

x) Dinf. 51/1.2. D. D. - 111

durch schrittweises Einbringen der gefrorenen Kügelchen in die jeweiligen Taupflüssigkeiten erzielt. Bei allen Versuchen wurde der Behälter mit der Taupflüssigkeit vorher in ein Wasserbad von 40°C gestellt, auf diese Temperatur erwärmt und während des Einbringens der gefrorenen Kügelchen stetig mäßig geschüttelt, um einen raschen Wärmeaustausch zu erzielen.

Um die Auswirkung verschiedener Taugeschwindigkeiten und verschiedener Taumedien auf die Lebensdauer der markierten gefrorenen Thrombozytenkonzentrate zu prüfen, wurden 70 ml homologes Plasma ($n = 7$), 70 ml physiologische Kochsalzlösung ($n = 4$), 40 ml homologes Plasma ($n = 11$), sowie lediglich auf 40°C vorgewärmte Erlenmeyerkolben ($n = 4$) verwendet.

5. Bestimmung der Gefrier- und Taugeschwindigkeit

Taucht ein Flüssigkeitstropfen in ein flüssiges Gas, bildet sich durch die Wärmeabgabe in unmittelbarer Umgebung des Tropfens eine Dampfschicht. Diese hält den Tropfen so lange an der Oberfläche schwimmend, bis sich die Temperatur des Tropfens an die der Umgebung angeglichen hat. Daraufhin hört die Dampfbildung auf und der Tropfen taucht unter.

Zu einer annähernden Bestimmung der Gefriergeschwindigkeit wurde daher die Zeitspanne vom ersten Kontakt der zu gefrierenden Tropfensuspension mit dem jeweiligen Gefriermedium bis zum völligen Untertauchen der gefrorenen Kügelchen bestimmt. Anschließend wurde das Temperaturintervall ($+20^{\circ}\text{C}$ bis -196°C)

bzw. -268°C) durch die gemessene Zeit dividiert. Dabei betrugen die Gefriergeschwindigkeiten bei Verwendung von flüssigem Stickstoff mehr als $10^{\circ}\text{C}/\text{sec}$, bei Verwendung von flüssigem Helium mehr als $100^{\circ}\text{C}/\text{sec}$.

Zur Bestimmung der annähernden Taugeschwindigkeit wurde die Zeitspanne vom ersten Kontakt der gefrorenen Kügelchen bis zu deren völligem Zerfließen ermittelt und die gesamte Temperaturdifferenz durch diese Zeit dividiert.

6. Bestimmung der Thrombozytenlebensdauer mit ^{51}Cr

a) Bestimmung des Standards aus der transfundierten Suspension

Vor der homologen Transfusion wurden aus der Suspension zwei Proben a o, 25 ml entnommen, um die injizierte Thrombozytenaktivität (= Standard am Tage 0, Doppelbestimmung) zu ermitteln.

Um eventuell noch vorhandene Erythrozyten zu zerstören, wurden noch je 1,95 ml 1%ige Ammoniumoxalatlösung zugesetzt und die Proben dann 10 Minuten stehengelassen. Nach dieser Zeit wurde mit physiologischer Kochsalzlösung bis auf 8 ml aufgefüllt, um eine ausreichende Menge meßbarer Suspension zu erhalten.

Anschließend wurden die Proben 40 Minuten bei 2000 g scharf zentrifugiert und der Überstand bis auf 4 ml entnommen.

Die Thrombozytenaktivität wurde so bestimmt, daß von der Suspensionsaktivität die Aktivität des Überstandes subtrahiert wurde. Diese Aktivitäten wurden bei einer Impulsvorwahl von 40.000 in einem Szintillationszähler_x) gemessen.

Unter Berücksichtigung des Blutvolumens (5,5 % des Körpergewichtes) errechneten wir den Sollwert nach folgender Formel:

$$\text{Sollwert} = \frac{\text{Mittelwert der Thrombozytenaktivität} \times \text{infundierte Menge}}{0.25 \times (\text{Blutvolumen} + \text{infundierte Menge})} \left[\text{Imp/min} \right]$$

- b) Bestimmung des Aktivitätsabfalles der markierten Thrombozyten im peripheren Blut

Die Thrombozytenaktivität wurde täglich bis zu ihrem völligen Verschwinden bestimmt, erstmals 30 Minuten p. i.

Aus 1 ml ACD - Blut wurden die Thrombozyten durch dreimaliges Zentrifugieren für 5 Minuten bei 500 g und jeweiliger Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung isoliert.

Aus dem gesammelten Überstand konnten die Thrombozyten durch scharfes Zentrifugieren für 30 Minuten bei 2000 g ab-sedimentiert werden.

Der Überstand wurde bis auf 4 ml abgesaugt, die Aktivität des Sedimentes und des Überstandes im Zähler gemessen und voneinander subtrahiert.

Die an den Abnahmetagen ermittelten Werte der Thrombo-

x) Autowell I Probenwechsler - System der Firma Picker

zytenaktivität wurden in Prozent des Sollwertes ausgedrückt und unter Berücksichtigung des physikalischen Abklingfaktors von ^{51}Cr im linearen Maßstab gegen die Zeit aufgetragen.

C. E R G E B N I S S E

1. Einfluß der Gefrierengeschwindigkeit auf die Thrombozytenlebensdauer (ohne Zugabe von Schutzstoffen)

THROMBOZYTENAKTIVITÄT % DES SOLLWERTES

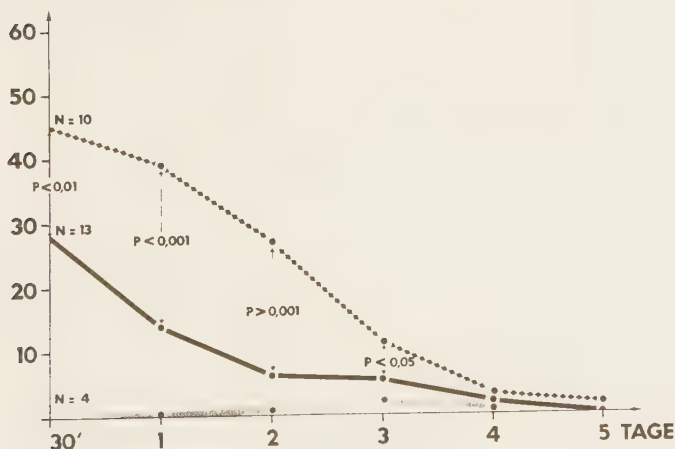


Abb. 1: Abbau rasch in flüssigem N₂ (—) und He (▨▨▨▨) gefrorener Kaninchenthrombozyten im Vergleich zur ungefrorenen Kontrollgruppe (◆◆).

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, wurden die am schnellsten mit einer Gefriereschwindigkeit von mehr als 100°C/sec durch direktes Eintropfen in flüssiges Helium gefrorenen Thrombozytenkonzentrate nahezu vollständig zerstört: 30 Minuten nach der

Reinjektion waren im peripheren Blut nur noch 1,3 % der injizierten Thrombozytenaktivität nachweisbar. Im Gegensatz hierzu betrug die Thrombozytenaktivität bei den in flüssigem Stickstoff mit einer Gefriereschwindigkeit von mehr als $10^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ gefrorenen Thrombozytenkonzentraten 30 Minuten nach der Reinjektion noch 28,4 % des Sollwertes, das sind 63,4 % der Thrombozytenaktivität der ungefrorenen Kontrollgruppe. Am dritten Tag waren noch 5,7 % der injizierten Thrombozytenaktivität nachweisbar. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Überlebensrate bis zum dritten Tag signifikant erniedrigt, siehe Abbildung 1.

2. Einfluß der T a u g e s c h w i n d i g k e i t auf die Thrombozytenlebensdauer

Der Einfluß der Taugeschwindigkeit wurde an Thrombozytenkonzentraten geprüft, die ohne Zusatz eines Gefrierschutzmittels in flüssigem Stickstoff gefroren worden waren. Dabei betrug die Taugeschwindigkeit bei Verwendung verschiedener Volumina (10 ml, 40 ml, 70 ml) homologen Plasmas oder physiologischer Kochsalzlösung mehr als $45^{\circ}\text{C}/\text{sec}$, bei Verwendung eines vorgewärmten Erlenmeyerkolbens ohne Zusatz irgendeiner Flüssigkeit etwa $6^{\circ}\text{C}/\text{sec}$.

Kein signifikanter Unterschied zeigte sich im Kurvenverlauf der mit höherer Geschwindigkeit getauten Proben, siehe Abbildung 2. Dagegen waren die mit einer Taugeschwindigkeit von $6^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ getauten Proben derart geschädigt, daß p. i. im peripheren Blut keine wesentliche Aktivität mehr nachweisbar war.

Nur schwer reversible Verklumpungen wurden bei Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung beobachtet.

THROMBOZYTENAKTIVITÄT % DES SOLLWERTES

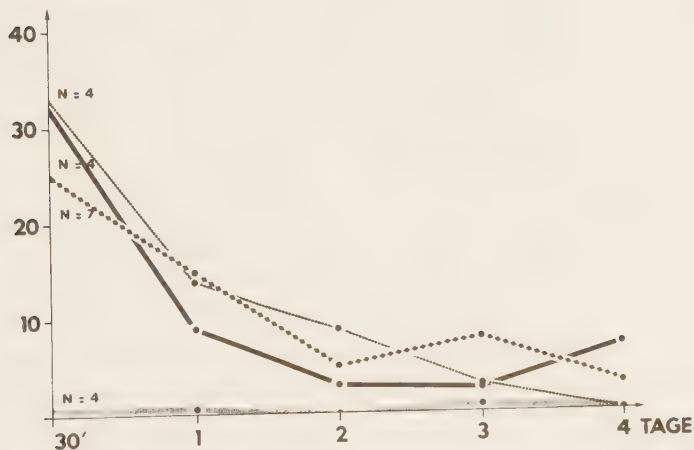


Abb. 2: Abbau rasch in flüssigem N_2 gefrorener Kaninchen-thrombozyten bei verschiedenen Taugeschwindigkeiten

(getaut in 10 ml homologem Plasma
 70 ml physiologischer NaCl ———
 70 ml homologem Plasma ◆ ◆ ◆
 ohne Taupflüssigkeit |||||)

Unter Berücksichtigung der hier erhaltenen Ergebnisse wurden alle unter Abschnitt 1 und Abschnitt 3 genannten Thrombozytenkonzentrate, die der Feststellung einer optimalen Gefriergeschwindigkeit bzw. eines brauchbaren Gefrierschutzmittels dienten, in 40 ml homologem Plasma getaut.

3. Einfluß verschiedener Gefrierschutzstoffe auf die Thrombozytenlebensdauer

Da die Thrombozytenkonzentrate nach dem Gefrieren in flüssigem Helium, also bei einer Gefriergeschwindigkeit von mehr als $100^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ nahezu völlig zerstört waren, wurde der Einfluß der Gefrierschutzstoffe nur auf in flüssigem Stickstoff gefrorene Thrombozytenkonzentrate, d. h. bei einer Gefriergeschwindigkeit von mehr als $10^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ geprüft.

Als Schutzstoffe wurden Glycerin in einer Endkonzentration von 10 % und eine Kombination von Dimethylacetamid (DMAC) und Dextrose in einer Endkonzentration von jeweils 5 % verwendet. Der Thrombozytenabbau dieser beiden Gruppen wurde verglichen einerseits mit dem der in flüssigem Stickstoff ohne Schutzstoff gefrorenen Thrombozytenkonzentrate, andererseits mit dem der ungefrorenen Kontrollgruppe, siehe Abbildung 3.

Der Kurvenverlauf der mit Glycerin gefrorenen Thrombozytenkonzentrate zeigte gegenüber den ohne Schutzstoff gefrorenen Thrombozytenkonzentraten nach 30 Minuten und nach 24 Stunden signifikant schlechtere Werte. Die gefundene Thrombozytenaktivität betrug 13,3 % bzw. 7,2 % des Sollwertes.

Bei Verwendung der Kombination von DMAC und Dextrose wurden 30 Minuten nach der Reinjektion durchschnittlich 34,8 %, 24 Stunden p. i. 33,6 %, am zweiten Tag 6,7 % und am dritten Tag 6,7 % der injizierten Thrombozytenaktivität gemessen. Gegenüber den mit Glycerin gefrorenen Thrombozytenkonzentraten war die Überlebensrate 30 Minuten und 24 Stunden nach der Transfusion signifikant erhöht. Im Vergleich zu den ungefrorenen

THROMBOZYTENAKTIVITÄT % DES SOLLWERTES

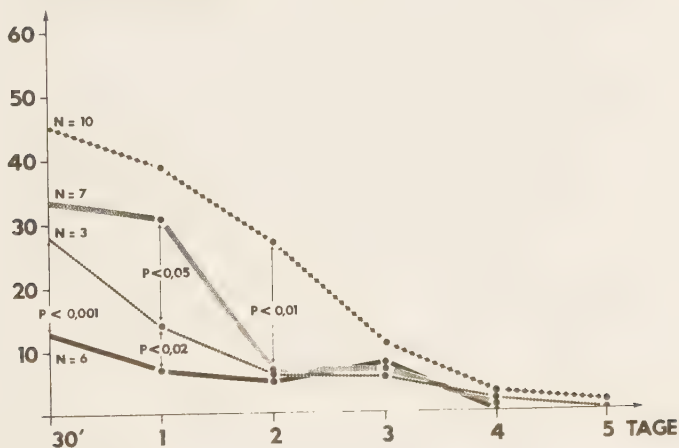


Abb. 3: Abbau rasch in flüssigem N_2 gefrorener Kaninchen-thrombozyten ohne Gefrierschutzstoff (●●●), mit 10 % Glycerin (—) und einer Kombination aus 5 % DMAC und 5 % Dextrose (▨▨▨▨).

Kontrollgruppen waren die Mittelwerte dieser Versuchsreihe nach 30 Minuten und 24 Stunden nicht signifikant erniedrigt. Es konnte hier die größte Ausbeute mit 75,0 % bzw. 78,2 % gegenüber den ungefrorenen frischen Thrombozytenkonzentraten verzeichnet werden. Erst am zweiten Tag nach der Reinjektion ergab sich eine statistisch signifikante Erniedrigung.

D. DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen über die Tiefkühlkonservierung von Kaninchenthrombozyten zeigen, daß bei einer Gefriergeschwindigkeit von mehr als $10^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ die zusätzliche Verwendung einer Schutzstoffkombination aus Dimethylacetamid und Dextrose zum Teil signifikant bessere Ergebnisse liefert. Im Hinblick auf die Konservierung menschlicher Thrombozyten erscheinen jedoch die ohne Schutzstoffe erzielten Resultate von größerer Bedeutung, da noch nicht hinreichend geklärt ist, in welchem Maße die als Gefrierschutz wirksamen Substanzen schädigend auf den menschlichen Organismus wirken. Ein aufwendiges Verfahren zur Abtrennung dieser Stoffe vom Zellkonzentrat würde die Praktikabilität der Methode erheblich beeinträchtigen und wäre wahrscheinlich auch mit einem zusätzlichen Verlust an Thrombozyten verbunden.

Die Abhängigkeit des Konservierungserfolges von der Gefriereschwindigkeit weist darauf hin, daß das Überleben der Thrombozyten an Vorgänge gebunden ist, die während der Abkühlung der Zellen und ihrer Umgebung stattfinden. Da bei einer Abkühlungsrate von mehr als $10^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ mit Sicherheit das Auftreten massiver Eiskristalle zu erwarten ist, sind diese zeitabhängigen Vorgänge wohl als Gefrierschutz im Sinne einer Verringerung der Verletzlichkeit durch Eiskristalle wirksam. Hierfür spricht der nicht unerhebliche Anteil an Thrombozyten, die den Gefriervorgang ohne Schutzstoff zirkulationsfähig überstehen.

Läßt man bei rascher Gefrierung den Zellen und ihrer Umgebung nicht genügend Zeit zum Ablauf dieser Mechanismen, tritt eine Schädigung der Zellen ein. Die in flüssigem Helium bei einer Gefrier-

geschwindigkeit von mehr als $100^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ gefrorenen Thrombozyten erweisen sich als nahezu völlig zerstört. Sie zirkulieren nach der homologen Transfusion nicht mehr im peripheren Blut. Bei diesem Experiment stand als Ziel eine weitere Möglichkeit des Gefrier-schutzes vor Augen, nämlich die Vermeidung der Bildung massiver Eiskristalle und der damit verbundenen mechanischen Schädigung der Zellen. Da das Wachstum der Eiskristalle ein zeitgebundener Vorgang ist, ist es durch sehr rasches Durchlaufen der Tempera-turzone, in der das Eiskristallwachstum erfolgen kann, theoretisch möglich, die Kristallgröße durch eine amorphe Vitrifikation unge-fährlich klein zu halten. Dies wurde durch das Eintropfen der Throm-bozyten in flüssiges Helium bei einer mittleren Tropfengröße von etwa 2,6 mm Durchmesser und einer Gefriergeschwindigkeit von mehr als $100^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ offensichtlich nicht erreicht. Da Helium als Edelgas biologischem Material gegenüber inert ist, kann es als Ur-sache für die Zellschädigung ausgeschlossen werden.

Die Versuchsreihe mit verschiedenen hohen Taugeschwindigkeiten zeigt, daß ein hinreichend großer Wärmeaustausch notwendig ist, um eine Zellschädigung zu verhindern. Dabei erweist sich eine Tau-geschwindigkeit von $40^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ als ausreichend. Nahezu völlig ge-schädigt waren die Zellen bei einer Taugeschwindigkeit von $6^{\circ}\text{C}/\text{sec}$. Nach diesem Ergebnis erweisen sich die Kaninchenthrombozyten ge-genüber den Gefriergeschwindigkeiten empfindlicher als gegenüber den Taugeschwindigkeiten.

Abschließend kann festgestellt werden, daß nach den in dieser Ar-beit durchgeführten Tierversuchen eine Tiefkühlkonservierung von Kaninchenthrombozyten ohne die Verwendung von Schutzstoffen möglich erscheint. Vielleicht kann in weiteren Untersuchungen die

Gefriergeschwindigkeit bis zur amorphen Vitrifikation der intra- und extrazellulären Flüssigkeiten gesteigert werden. Die hier dargestellte Methode scheint nach Modifizierung (z. B. Verwendung von Plastikbeuteln, Verbesserung der Sterilität) für die Anwendung beim Menschen erfolgversprechend zu sein.

Herrn Prof. Dr. W. Stich danke ich für die Überlassung des Themas und für die Arbeitsmöglichkeiten, die er mir in der nuklearhämatologischen Abteilung seines Institutes eingeräumt hat.

Herrn Dr. med. H. Pfisterer und Herrn Dipl. -Phys. Walter Ruppelt danke ich für die vorbildliche Zusammenarbeit und Beratung bei der Bearbeitung dieses Themas.

Für die Hilfe bei der technischen Durchführung der Versuche bedanke ich mich besonders bei den med. -techn. Assistentinnen Frau Ursula Michlmayr und Frau Margret Nohe.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde in vivo die Abbaurates rasch gefrorener und getauter homolog transfundierter Thrombozytenkonzentrate von Kaninchen nach in vitro Markierung mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ bestimmt und mit der Abbaurates frischer ungefrorener Thrombozytenkonzentrate verglichen. Dabei zeigte sich, daß die direkt in flüssiges Helium (-268°C) eingetropften Thrombozytenkonzentrate bei einer Gefriereschwindigkeit von mehr als $100^\circ\text{C}/\text{sec}$ ohne Zusatz eines Gefrierschutzstoffes nahezu völlig zerstört wurden, während die in flüssigem Stickstoff (-198°C) bei einer Gefriereschwindigkeit von mehr als $10^\circ\text{C}/\text{sec}$ ebenfalls ohne Zusatz eines Gefrierschutzstoffes gefrorenen Thrombozytenkonzentrate 30 Minuten nach der Reinjektion 63,4 % und 24 Stunden darnach 36,3 % der Thrombozytenaktivität der ungefrorenen Kontrollgruppe aufwiesen.

Dieser Prozentsatz konnte durch die Verwendung einer Kombination aus 10 % Dimethylacetamid und 10 % Dextrose als Schutzstoffe auf 75,0 % bzw. 78,2 % gesteigert werden. 10 %iges Glyzerin zeigte sich im Vergleich dazu signifikant weniger als Schutzstoff geeignet und war sogar den Abbaurates der in flüssigem Stickstoff ohne Zusatz eines Gefrierschutzstoffes gefrorenen Thrombozytenkonzentrate unterlegen.

Untersuchungen über den Einfluß der Taugeschwindigkeit zeigten, daß günstige Ergebnisse mit einer Geschwindigkeit von mehr als $40^\circ\text{C}/\text{sec}$ erzielt wurden, während eine Taugeschwindigkeit von ca. $6^\circ\text{C}/\text{sec}$ eine nahezu vollständige Zerstörung der Thrombozytenkonzentrate zur Folge hatte.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Aster, R. H., and Jandl, J. H. Platelet sequestration in man. I. Methods.
J. Clin. Invest. 43, 843 - 855, 1962
- 2) Baldini, M., Ebbe, S., and Dameshek, W. The use of a special preservation medium for the maintenance of platelet viability at 4°C.
Blood, 15, 909 - 917, 1960
- 3) Ballinger, W. F., Weiss, A. J., Jackson, L. G., and Barr, M. A. In vivo and in vitro survival of glycerolized frozen platelets.
J. A. M. A. 179, 148 - 149, 1958
- 4) Cohen, P., Cooley, M. H., and Gardner, F. H. Glycerol preservation of platelet concentrates derived from ACD blood.
Clin. Res., 13, 269, 1965
- 5) Cohen, P., and Gardner, F. H. Platelet preservation II. Preservation of canine platelet concentrates by freezing in solutions of glycerol plasma.
J. Clin. Invest. 41, 10, 1962
- 6) Cohen, P., and Gardner, F. H. Platelet preservation IV. Preservation of human platelet concentrates by controlled slow freezing in a

glycerol medium.

New Eng. J. Med., 274, 1400 - 1407, 1966

7) Djerassi, I.,

and Roy, A. A method for preservation of viable platelets: Combined effects of sugars and dimethylsulfoxide.

Blood, 22, 703 - 717, 1963

8) Farber, S.,

Djerassi, I., Roy, A., Cavins, J., and Klein, E. Agent improves platelet preservation

J. A. M. A., 197, 36, 1966

9) Gross, R.,

Löhr, G. W., and Waller, H. D. Long term preservation of functionally intact platelets.

In Proceeding of 7th European Congress on Hematology, London, S. Karger, No. 202, 1959, pp. 686 - 691.

10) Lossifides, I.,

Geisler, P., Eichmann, M. F., and Tocantins, L. M. Preservation of the clot-reacting activity of platelets by freezing in dimethylsulfoxide and plasma. Transfusion, 3, 167 - 172, 1963

11) Lundberg, A.,

Pert, J. H., and Zucker, M. B. In vitro testing of frozen blood platelets.

In Report on the 18th Annual Meeting of the AABB, Los Angeles, Calif.-. 1966.

Unpublished.

- 12) Moor, H. Die Gefrierfixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie.
Z. Zellforsch., 62, 546 - 580, 1964
- 13) Raccuglia, G., and Zarafonitis, C. J. D. Correction of radiation-induced thrombocytopenia and bleeding tendency by preserved platelets.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 110, 641 - 645, 1962
- 14) Rinfret, A.P. Cryobiology, J. St. Barnabas Med. Center
4, 267 - 274, 1967

LEBENS LAUF

Am 13. Oktober 1943 wurde ich in Weilheim in OB als Sohn des Dr. med. dent. Fritz Weber und seiner Ehefrau Margarethe Weber, geborene Wirth, geboren. Nach dem Besuch der Volksschule trat ich im Jahre 1954 in das Gymnasium Weilheim ein und absolvierte im Jahre 1963 im humanistischen Zweig mein Abitur. Von 1963 bis 1969 studierte ich an der Universität München 12 Semester Medizin (davon ein Semester Zahnmedizin) und legte im Dezember 1969 das Medizinische Staatsexamen ab. Nach Ableistung der Medizinalassistentenzeit im Knappschaftskrankenhaus Peißenberg erhielt ich am 1. Januar 1971 die Approbation als Arzt. Bis zum Herbst 1971 war ich weiterhin in Peißenberg als Assistenzarzt auf der Inneren Abteilung des Krankenhauses tätig. Von Oktober 1971 bis Dezember 1971 leistete ich meine dreimonatige Wehrpflicht als Stabsarzt ab. Seit dem 1. Januar 1972 arbeite ich am städtischen Krankenhaus Weilheim in OB als Assistenzarzt auf der Geburtshilflich-Gynäkologischen Abteilung.

